

ROZWÓJ PŁODOWYCH GONAD ŚWINI A ŚRODOWISKO HORMONALNE

DEVELOPMENT OF PORCINE FETAL GONADS AND THE HORMONAL MILIEU

Katarzyna KNAPCZYK-STWORA, Małgorzata GRZESIAK

Zakład Endokrynologii, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: W rozwoju embrionalnym ssaków rozwój jąder i jajników z nieodróżnianej gonady jest determinowany przez informację genetyczną. Jednak podstawową rolę w kształtowaniu męskiego lub żeńskiego fenotypu podczas rozwoju płodowego pełnią hormony steroidowe. Zarówno androgeny, jak i estrogeny zaangażowane są w różnicowanie wewnętrznych i zewnętrznych narządów płciowych. Androgeny, chociaż nazywane „hormonami męskimi”, odgrywają również istotną rolę w rozwoju oraz utrzymaniu prawidłowych funkcji żeńskiego układu rozrodczego. Hormony te uważane są za nowy czynnik regulujący wczesne etapy folikulogenezy. Z kolei estrogeny, zwane dawniej „hormonami żeńskimi”, mają znaczenie również w rozwoju i funkcjonowaniu płodowego jądra. Kontrola i regulacja hormonalna może być zakłócona przez występujące w środowisku związki zaburzające procesy endokrynne (tzw. endocrine disruptors), co może negatywnie wpływać na wiele procesów życiowych, w tym tych, związanych z rozrodem. W świetle doniesień o wzrastającej ekspozycji na substancje o działaniu hormonalnym, które mogą naśladować, antagonizować czy maskować działanie hormonów steroidowych, takie zachwianie równowagi hormonalnej w rozwijających się gonadach może skutkować zaburzeniami płodności u dorosłych samców i samic. Niniejszy artykuł podsumowuje aktualną wiedzę na temat wpływu androgenów i estrogenów na rozwój płodowych gonad świni, z uwzględnieniem możliwej roli występujących w środowisku związków zaburzających działanie endogennych hormonów. Świnia jest obecnie coraz częściej wykorzystywana jako organizm modelowy w badaniach biomedycznych.

Słowa kluczowe: androgeny, estrogeny, gonady płodowe, świnia

Summary: The differentiation of mammalian bipotential gonad is genetically determined. However, steroid hormones are fundamental to the generation of male or female phenotype during fetal development. Both androgens and estrogens direct the differentiation of the accessory sex ducts and external genitalia. Androgens, known as “male hormones”, play also a crucial role in development of female reproduction tract and its functioning. These steroid hormones are implicated as a new factor

regulating the early stages of folliculogenesis. On the other hand, estrogens named “female hormones” are involved in regulation of fetal testis development. Environmental substances known as endocrine disruptors can alter the functions of this hormonal system, resulting in dysfunction of reproductive processes. In the light of recent reports regarding to the increasing exposure to endocrine disruptors, which can mimic, antagonize or mask endogenous hormones’ action, such hormonal imbalance may affect reproductive functions in adulthood. In this review we summarize current knowledge about the role of androgens and estrogens in fetal gonads development in pig, with focus on possible role of endocrine disruptors. The pig has recently become increasingly relevant as a model organism for biomedical research.

Key words: androgens, estrogens, fetal gonads, pig

Wykaz stosowanych skrótów: **3 β -HSD** – dehydrogenaza 3 β -hydroksysteroidowa; **17 β -HSD** – dehydrogenaza 17 β -hydroksysteroidowa; **AMH** – hormon anty-mullerowski (ang. *Anti Müllerian Hormone*); **BMP2** – białko morfogenetyczne kości 2 (ang. *Bone Morphogenesis Protein 2*); **CYP11A** – kompleks enzymatyczny cytochromu P450_{sc} odszczepiający boczny łańcuch cholesterolu; **CYP17** – kompleks enzymatyczny cytochromu P450 17 α -hydroksylaza/ 17;20-liaza; **CYP19** – kompleks enzymatyczny cytochromu P450 aromatazy; **DHH** – czynnik sygnalizacyjny Desert Hedgehog (ang. *Desert Hedgehog*); **EMX2** – ang. *Empty Spiracles Homologue 2*; **FSH** – folitropina (ang. *Follicle-Stimulating Hormone*); **Fst** – folistatyna (ang. *Follistatin*); **LH** – lutropina (ang. *Luteinizing Hormone*); **LHX9** – ang. *LIM homeobox protein 9*; **M33** – ang. *chromobox homologue 2*; **MAPK** – kinaza MAP (ang. *Miogen Activated Protein Kinase*); **PDGF** – płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. *Platelet-Derived Growth Factor*); **PI₃K** – 3-kinaza fosfatydyloinozytoli; **PIP₂** – fosfatydyloinozytolo-3; 4-difosforan; **PKA** – kinaza białkowa A (ang. *Protein Kinase A*); **PKC** – kinaza białkowa C (ang. *Protein Kinase C*); **PLC** – fosfolipaza C (ang. *Phospholipase C*); **SFI** – czynniki steroidogenne 1 (ang. *steroidogenic factor 1*); **Sox9** – gen kodujący czynnik transkrypcyjny należący do białek grupy HMG (ang. *Sry-like HMG-box protein 9*); **Sry** – gen kodujący czynnik determinujący rozwój jądra (ang. *Y-chromosomal testis-determining factor*); **StAR** – białko natychmiastowo regulujące steroidogenezę (ang. *Steroidogenic Acute Regulatory protein*); **RSPO1** – R-spondyna 1 (ang. *R-spondin 1*); **Wnt** – szlak sygnalizacyjny Wnt, kombinacja nazw homologicznych genów *Wg* (*wingless*) i *Int*; **WNT4** – ang. *Wingless-type MMTV integration site 4*; **WT1** – czynnik transkrypcyjny hamujący rozwój guza Wilmsa (ang. *Wilms' Tumor supresor 1*)

WSTĘP

Prawidłowe funkcjonowanie narządów rozrodczych uzależnione jest od ich właściwego rozwoju w okresie życia płodowego. Podstawową rolę w kształtowaniu męskiego lub żeńskiego fenotypu podczas rozwoju płodowego ssaków pełnią hormony steroidowe. Kontrola i regulacja hormonalna może być zakłócona przez występujące w środowisku związki zaburzające procesy endokrynne (tzw. ang. *endocrine disruptors*), co może negatywnie wpływać na wiele procesów życiowych, w tym tych związanych z rozrodem. Zarówno niedobór, jak i nadmiar hormonów steroidowych podczas ciąży jest przyczyną zaburzeń związanych z rozrodem u samców i samic po osiągnięciu dojrzałości płciowej. Znane i powszechnie używane zwierzęta modelowe, takie jak *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio* czy gryzonie, nie zawsze w wystar-

czający sposób odzwierciedlają fizjologię człowieka. Prowadzone w ostatnim czasie badania wskazują, że dzięki szczególnemu podobieństwu budowy anatomicznej narządów wewnętrznych i przebiegu procesów fizjologicznych, najbardziej odpowiednim zwierzęciem modelowym stosowanym w badaniach biomedycznych jest świnia. Jest ona wykorzystywana jako model w badaniach dotyczących funkcjonowania serca, skóry, układu pokarmowego, nerwowego i oddechowego oraz rozrodczego [7]. Poznanie precyzyjnych i złożonych mechanizmów rozwoju gonad płodowych świni oraz określenie znaczenia hormonów steroidowych w tym procesie jest kluczowe w poznaniu przyczyn leżących u podstaw zaburzeń funkcji rozrodczych, w tym również u człowieka.

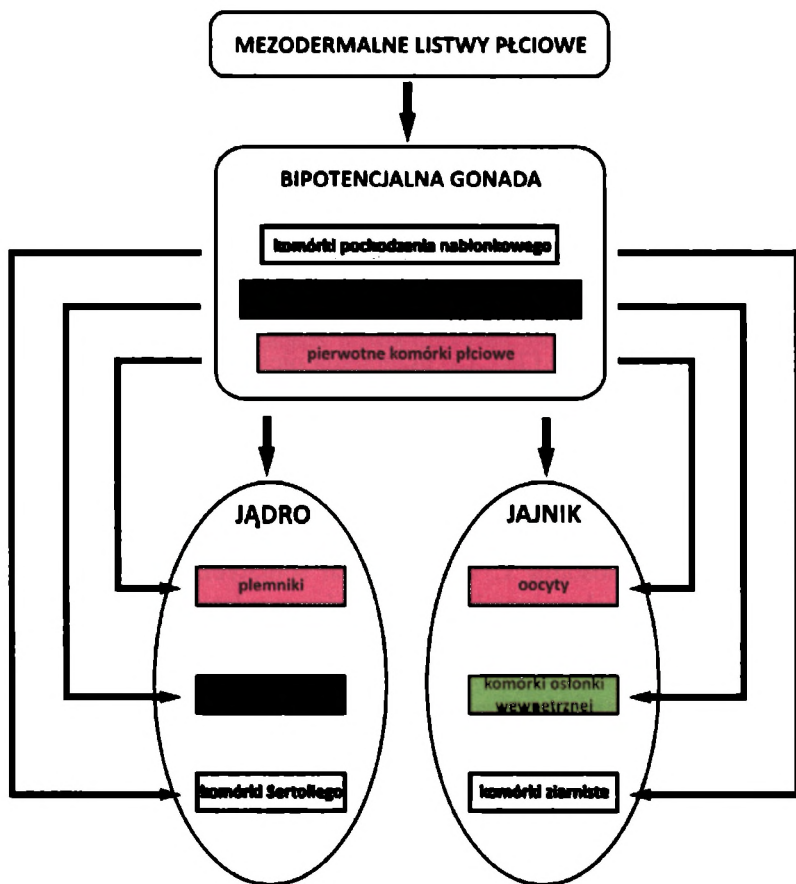
ETAPY DETERMINACJI PŁCI

U ssaków wyróżnia się trzy etapy determinacji płci. W momencie zapłodnienia determinowana jest płeć genetyczna, o której decyduje obecność w plemniku chromosomu X lub Y [50]. Podczas rozwoju embrionalnego informacja genetyczna determinuje płeć gonadalną, kierując rozwojem jąder lub jajników z gonady niezróżnicowanej (bipotencjalnej). Somatyczny zawiązek gonady ssaków, zwany grzebieniem płciowym, tworzy się na śródnerczu w postaci podłużnego pasma komórek mezenchymalnych, pokrytych nabłonkiem powierzchniowym. Proces formowania bipotencjalnego grzebienia płciowego zachodzi pod kontrolą takich czynników jak: WT1, SF1, EMX2, M33 oraz LHX9 [78]. Do grzebienia płciowego od podstawy omocznici migrują pierwotne komórki płciowe.

U ssaków płcią podstawową jest płeć żeńska. Jeśli nie zadziała sygnał wywoławczy prowadzący do powstania płci męskiej, samorzutnie realizowany zostaje podstawowy wzorzec ekspresji genów prowadzący do powstania płci żeńskiej [81]. Uważa się, że sygnałem wywoławczym jest ekspresja genu *Sry*, zlokalizowanego na krótkim ramieniu chromosomu Y, w komórkach somatycznych zawiązka gonady. W ten sposób zostaje uruchomiona kaskada genów regulatorowych, prowadząca do aktywacji genów bezpośrednio odpowiedzialnych za różnicowanie komórek somatycznych [78]. Czynnik SRY prawdopodobnie bezpośrednio uruchamia transkrypcję autosomalnego genu *Sox9*, podwyższającego ekspresję FGF9, który zwrótnie aktywuje ekspresję *Sox9* i hamuje ekspresję genów szlaku żeńskiej determinacji płci. Ponadto *Sox9* aktywuje ekspresję genów kierujących rozwojem jądra, takich jak DHH i PDGF [66]. Badania na myszach wykazały, że *Sox9* jest genem kluczowym w determinacji płci, pomimo że jego ekspresja początkowo obserwowana jest u obu płci. Dopiero obecność SRY powoduje wzrost ekspresji *Sox9* u samców, a brak SRY u samic jej spadek. Ponadto inaktywacja *Sox9* u osobników o genotypie XY powoduje całkowite odwrócenie płci [6]. Aktywacja czynnika SRY prowadzi do gwałtownego wzrostu

stężenia czynników „szlaku męskiego”, niezbędnego z jednej strony do obniżenia ekspresji czynników „szlaku żeńskiego”, a z drugiej strony do aktywacji ekspresji czynników bezpośrednio kierujących różnicowaniem jądra [66].

W niezróżnicowanej gonadzie obok pierwotnych komórek płciowych, można wyróżnić trzy populacje komórek somatycznych: wspierające, steroidogenne oraz stromy. Każda z tych populacji, zgodnie z płcią gonadalną, daje początek komórkom charakterystycznym dla gonady męskiej lub żeńskiej [50] (ryc.1). Aktywność genu *Sry* powoduje, że komórki wspierające różnicują się w komórki Sertoliego, a steroidogenne, w płodowe komórki Leydiga. Produkowany przez komórki Sertoliego hormon AMH stymuluje zanik przewodów Müllera. Z kolei produkcja testosteronu przez płodowe komórki Leydiga, umożliwia przekształcenie śródnercza w najądrze, a przewodów Wolffa w nasieniowody.



RYCINA 1. Różnicowanie się jądra i jajnika z bipotencjalnej gonady
FIGURE 1. Differentiation of testis and ovary from bipotential gonad

W przypadku braku chromosomu Y, a tym samym braku sygnału wywoławczego, gonada różnicuje się w jajnik. W genetyczną determinację płci żeńskiej zaangażowany jest szlak sygnalizacyjny Wnt. Główne czynniki determinacji płci żeńskiej, WNT4 oraz RSPO1 stabilizują β -kateninę, która z jednej strony hamuje ekspresję genów męskiego szlaku determinacji płci, a z drugiej strony podwyższa ekspresję genów kontrolujących rozwój jajnika, takich jak: BMP2 i Fst [66]. W takim przypadku, w bipotencjalnej gonadzie, komórki wspierające zaczynają różnicować się w komórki ziarniste, a steroidogenne stają się komórkami osłonki wewnętrznej. Wówczas przewody Müllera rozwijają się w jajowody, macicę i górną część pochwy, zaś przewody Wolffa degenerują z powodu braku testosteronu [41].

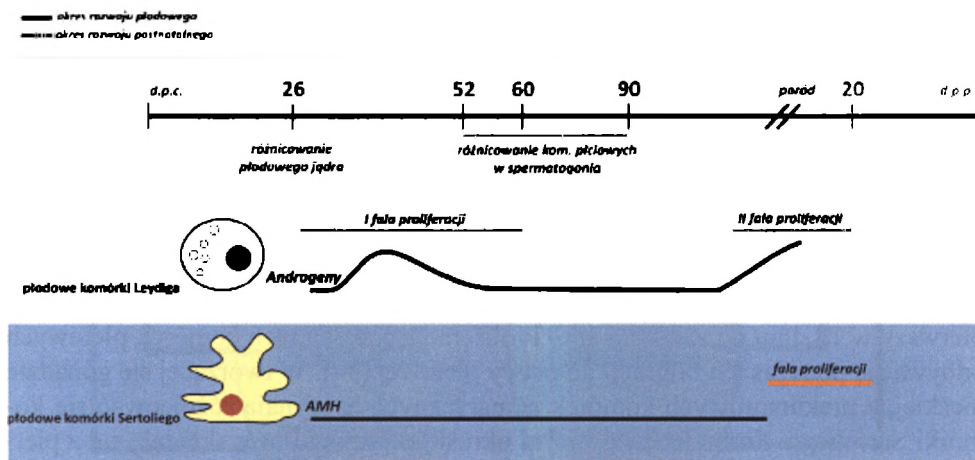
Ostatnim etapem jest determinacja płci fenotypowej, w wyniku działania odpowiednich hormonów steroidowych, produkowanych przez gonady. Etap ten rozpoczyna się w okresie życia płodowego i trwa do osiągnięcia dojrzałości płciowej. Środowisko hormonalne gonady decyduje o różnicowaniu się pierwotnych komórek płciowych w kierunku męskim lub żeńskim. Już doświadczenia Alfreda Josta [42] wykazały, że płeć fenotypowa jest zależna od obecności gonady. Usunięcie jądra we wczesnych okresach życia płodowego królika prowadziło zawsze do rozwoju płci żeńskiej, zaś owariektomia i implantacja jądra w żeńskich zarodkach skutkowała fenotypowym rozwojem samca [42]. Dlatego, zarówno niedobór jak i nadmiar hormonów steroidowych podczas ciąży jest przyczyną zaburzeń związanych z rozrodem u samców i samic po osiągnięciu dojrzałości płciowej. Niedobór estrogenów w środowiskowym i późnym okresie ciąży u pawiana wpływał na obniżenie liczby pęcherzyków pierwotnych u noworodków, redukcję wytwarzanych przez oocyt mikrokosmków, a w późniejszych okresach także na obniżenie wrażliwości pęcherzyków jajnikowych na FSH [2].

RÓŻNICOWANIE MĘSKIEGO I ŻEŃSKIEGO UKŁADU ROZRODCZEGO ŚWINI

U świni różnicowanie męskiego układu rozrodczego rozpoczyna się około 26 dnia po zapłodnieniu, ale pierwotne komórki płciowe identyfikowane są po raz pierwszy w 18 dniu po zapłodnieniu. Prolifercja pierwotnych komórek płciowych odbywa się podczas ich migracji do listwy płciowej [34]. W tworzącej się gonadzie męskiej, z prekursorowych komórek somatycznych zaczynają różnicować się komórki Sertoliego. Formujące się w tym okresie sznury płciowe składają się z pierwotnych komórek płciowych, komórek Sertoliego oraz otaczających je komórek mioidalnych. Komórki Sertoliego współpracują z komórkami mioidalnymi, tworząc błonę podstawną pierwotnego kanalik plemnikotwórczego [53]. Pomiędzy 52 a 90 dniem po zapłodnieniu, komórki płciowe różnicują się w spermatogonia, które migrują do błony podstawnej tworzącego się kanalik nasienne [34].

Około 30 dnia po zapłodnieniu, płodowe komórki Leydiga rozpoczynają produkcję androgenów, które inicjują rozwój fenotypu męskiego. Produkcja androgenów osiąga szczyt między 35 a 38 dniem ciąży. Po tym okresie ich synteza spada i pozostaje na niskim poziomie do końca okresu prenatalnego [35]. Wraz z syntezą androgenów dochodzi do wydzielania przez komórki Sertoliego AMH. Podczas rozwoju płodowego jądra, liczba komórek Sertoliego rośnie wskutek podziałów mitotycznych, których szczyt u świni przypada na późny okres neonatalny. Dojrzewanie komórek Sertoliego związane jest z przybraniem przez nie charakterystycznego kształtu, utworzeniem bariery krew-jądro oraz przzerwaniem aktywności mitotycznej, co ma miejsce w okresie postnatalnym [55]. Z kolei proliferacja i różnicowanie komórek Leydiga przebiega trójetapowo. Pierwsza fala proliferacji płodowych komórek Leydiga u świni ma miejsce między 27 a 60 dniem po zapłodnieniu i jest całkowicie niezależna od LH. Kolejna fala proliferacji komórek Leydiga rozpoczyna się pod koniec okresu płodowego i trwa do około 20 dnia po porodzie. Ostatnia fala proliferacji komórek Leydiga ma miejsce w okresie dojrzewania płciowego, co jest związane z funkcjonowaniem dojrzałej gonady męskiej [34] (ryc. 2).

W przypadku braku androgenów i AMH, w 33 dniu rozpoczyna się różnicowanie żeńskiego układu rozrodczego [54]. U większości gatunków ssaków, w tym również u świni, proces oogenezy rozpoczyna się bardzo wcześnie w rozwoju prenatalnym i jest asynchroniczny. W płodowym jajniku świni, obok mitotycznych oogoniów, obserwujemy mejotyczne oocyty oraz pęcherzyki pierwotne [8]. Po osiągnięciu zawiązka jajnika, pierwotne komórki płciowe tracą zdolność do migracji



RYCINA 2. Najważniejsze etapy w rozwoju płodowego jądra świni.

d.p.c. – dzień po zapłodnieniu (*post coitum*); d.p.p. – dzień po urodzeniu (*post partum*)

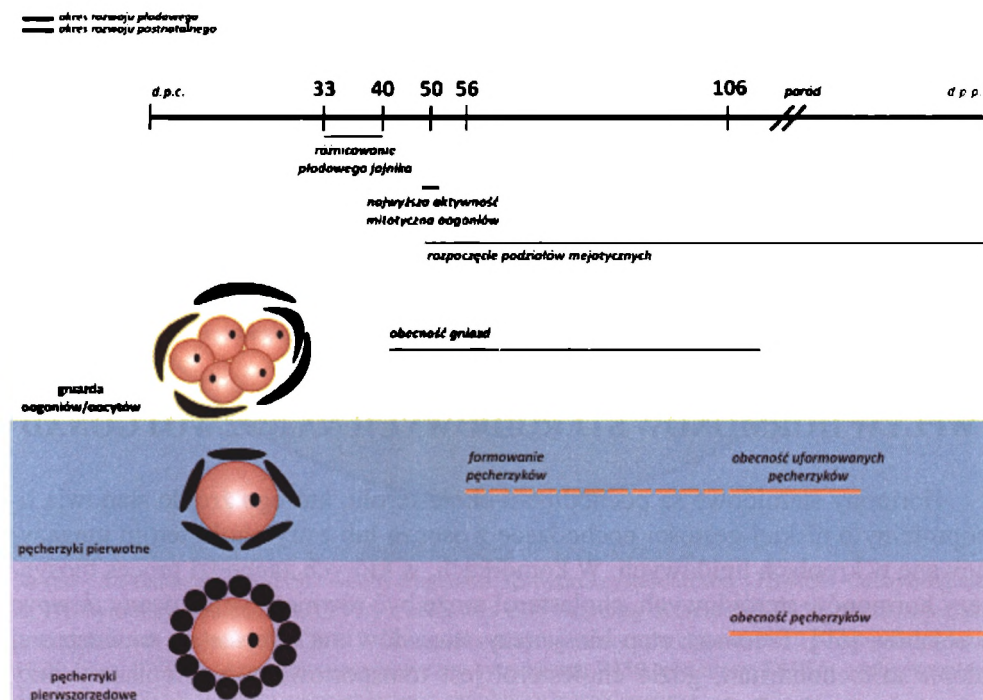
FIGURE 2. The crucial stages of fetal testis development in pig.

d.p.c. – day *post coitum*; d.p.p. – day *post partum*

i przyjmują kształt sferyczny. Od tego momentu nazywane są oogoniami i wykazują dużą aktywność mitotyczną. Najwyższą aktywność mitotyczną oogonia u świni posiadają w dniu 50 po zapłodnieniu [31]. Po wielu podziałach mitotycznych, w oogoniach inicjowany jest proces mejozy i oogonia stają się oocytami [85].

W rozwijającej się gonadzie żeńskiej, komórki nabłonka proliferują i wsuwają się do listwy płciowej w postaci pasm, które otaczają pierwotne komórki płciowe, tworząc sznury płciowe. Komórki nabłonka początkowo wypychają oogonia w kierunku zewnętrznym kory jajnika, powodując utworzenie sznurów i gniazd oogoniów, a następnie dzielą te gniazda na pojedyncze pęcherzyki [31]. Dlatego w kory rozwijającego się jajnika można wyróżnić część zewnętrzną kory z gniazdami oogoniów i oocytów oraz wewnętrzną – z pęcherzykami pierwotnymi.

Morfologicznie zróżnicowany jajnik świni jest już obserwowany około 40 dnia po zapłodnieniu, a około dnia 47 po zapłodnieniu oocyty zaczynają wchodzić w profazę podziału mejotycznego [8, 54]. Zarówno aktywność mitotyczna jak i mejotyczna w obrębie poszczególnych gniazd jest synchroniczna.



RYCINA 3. Kolejne etapy folikulogenezy zachodzące w płodowym jajniku świni.

d.p.c. – dzień po zapłodnieniu (*post coitum*); d.p.p. – dzień po urodzeniu (*post partum*)

FIGURE 3. The stages of fetal gonads development in pig.

d.p.c. – day *post coitum*; d.p.p. – day *post partum*

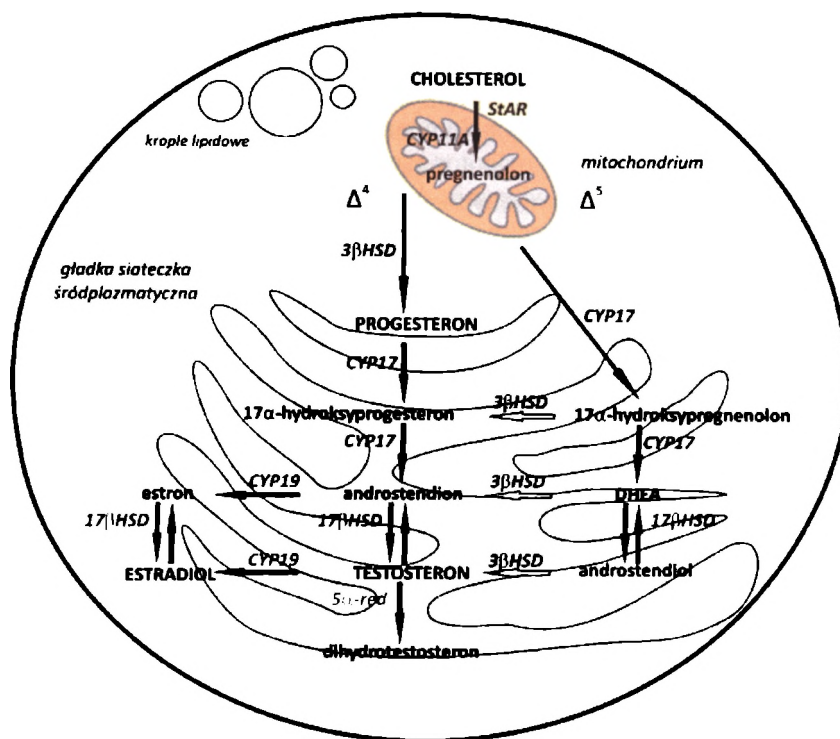
Proces folikulogenezy, czyli wzrostu i rozwoju pęcherzyków jajnikowych jest ciągły, dynamiczny i u ssaków rozpoczyna się w okresie życia płodowego samicy lub wkrótce po urodzeniu. Pierwsze pęcherzyki pierwotne obserwowano w jajnikach płodowych świni w 56 dniu po zapłodnieniu [8]. Jednak aby doszło do formowania pęcherzyków jajnikowych, niezbędna jest apoptoza losowych oocytów w gniazdach. Umożliwia to wnikanie komórek somatycznych do gniazd, które otaczają pozostałe oocyty, tworząc w ten sposób pęcherzyki pierwotne [67]. W takich pęcherzykach otaczająca oocyt warstwa płaskich komórek ziarnistych, nazywanych na tym etapie komórkami pre-ziarnistymi, jest jeszcze niekompletna. W momencie zakończenia procesu tworzenia pęcherzyków pierwotnych, ich liczba jest już zdeterminowana i tworzą one pulę, z której codziennie nowe pęcherzyki wchodzi w fazę wzrostu, aż do jej wyczerpania, co jest równoznaczne z wygaśnięciem czynności jajnika [74].

Kolejnym etapem rozwoju pęcherzyka jajnikowego świni, który zachodzi jeszcze w okresie płodowym, jest tranzycja pęcherzyków pierwotnych do pierwszorzędowych. W pęcherzykach pierwszorzędowych komórki ziarniste otaczające wzrastający oocyt mają kształt kuboidalny [73]. W jajniku świni pęcherzyki pierwszorzędowe formują się pod koniec ciąży [31]. Jednak mechanizm odpowiedzialny za selektywną rekrutację pęcherzyków pierwotnych oraz ich przekształcenie w pęcherzyki pierwszorzędowe nie jest do końca poznany. Intensywnie prowadzone badania wskazują na udział w tym procesie czynników wzrostu i czynników transkrypcyjnych [3, 68]. Również coraz więcej doniesień zwraca uwagę na rolę hormonów steroidowych we wczesnych etapach folikulogenezy [60, 84], co sugeruje, że rozwój gonady żeńskiej nie jest „rozwojem biernym”. Na rycinie 3 przedstawiono etapy folikulogenezy zachodzące w płodowym jajniku świni.

WPLYW HORMONÓW STEROIDOWYCH NA ROZWÓJ GONAD

Hormony steroidowe są pochodnymi cholesterolu, którego źródło stanowią lipoproteiny o niskiej gęstości pochodzące z osocza lub estry cholesterolu magazynowane w kroplach lipidowych. W komórkach, w których zachodzi proces biosyntezy hormonów steroidowych, cholesterol może być również syntezowany *de novo* z octanów [59]. Pierwszy etap biosyntezy steroidów ma miejsce na wewnętrznej błonie mitochondrium, gdzie cholesterol jest transportowany z cytoplazmy przy udziale białka StAR. Kompleks enzymatyczny CYP11A katalizuje odcięcie bocznego łańcucha cholesterolu, prowadząc do powstania pregnenolonu. Dalsza synteza steroidów z pregnenolonu odbywa się w gładkiej siateczce śródplazmatycznej i może przebiegać dwoma szlakami: Δ^4 lub Δ^5 . Na drodze Δ^4 pregnenolon jest przekształcany w progesteron przy udziale 3β -HSD, a następnie, w obecności CYP17,

w androstendion. Na drodze Δ^5 , pregnenolon ulega przemianie do dehydroepiandrosteronu (DHEA) przy udziale CYP17, a następnie w obecności 17 β -HSD, do androstendiolu. Ostatecznie androstendion zostaje zredukowany do testosteronu przy udziale 17 β -HSD. Z kolei testosteron może być metabolizowany do 5 α -dihydrotestosteronu lub estradiolu w obecności enzymów 5 α -reduktazy lub CYP19. Ten ostatni katalizuje także konwersję androstendionu w estron. Z estronu może również powstawać estradiol, a reakcja ta jest możliwa dzięki aktywności 17 β -HSD [52, 64]. Kolejne etapy steroidogenezy przedstawia rycina 4.



RYCINA 4. Biosynteza hormonów steroidowych na drogach Δ^4 oraz Δ^5 .

5 α -red – 5 α -reduktaza, 3 β -HSD – dehydrogenaza 3 β -hydroksysteroidowa, 17 β -HSD – dehydrogenaza 17 β -hydroksysteroidowa, CYP11A – kompleks enzymatyczny cytochromu P450_{sc} odszczepiający boczny łańcuch cholesterolu, CYP17 – kompleks enzymatyczny cytochromu P450 17 α -hydroksylaza/17,20-liaza, CYP19 – kompleks enzymatyczny cytochromu P450 aromatazy, DHEA – dehydroepiandrosteron, StAR – białko natychmiastowo regulujące steroidogenezę

FIGURE 4. Biosynthesis of steroid hormones via Δ^4 and Δ^5 pathways.

5 α -red – 5 α -reductase, 3 β -HSD – 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 17 β -HSD – 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, CYP11A – cholesterol side-chain cleavage enzyme, CYP17 – cytochrome P450 17 α -hydroxylase/c17,20-lyase, CYP19 – cytochrome P450 aromatase, DHEA – dehydroepiandrosterone, StAR – steroidogenic acute regulatory protein

ANDROGENY

Rola androgenów w rozwoju i funkcjonowaniu męskiego układu rozrodczego jest niezaprzeczalna. Jednak androgeny, chociaż nazywane „hormonami męskimi”, odgrywają również istotną rolę w rozwoju oraz utrzymaniu prawidłowych funkcji żeńskiego układu rozrodczego [80]. Androgeny działają na komórki docelowe poprzez receptory androgenowe (AR). AR należą do nadrodziny jądrowych receptorów steroidowych i są hormonozależnymi czynnikami transkrypcyjnymi, które po związaniu liganda, wpływają na aktywację transkrypcji genów. Jak wszystkie receptory steroidowe, AR charakteryzują się budową domenową. Domena N-końcowa pełni funkcję niezależnej od przyłączenia liganda aktywacji transkrypcji, która polega na fosforylacji reszt serynowych lub tyrozynowych przez kinazy białkowe [40]. Kolejna domena odpowiada za dimeryzację receptora i wiązanie kompleksu hormon-receptor z elementem odpowiedzi na androgeny (sekwencją ARE) w DNA. W wiązaniu do DNA współuczestniczy domena łącznikowa (zawias), zawierająca sekwencję sygnałową, dzięki której dochodzi do translokacji receptorów do jądra komórkowego. Domena C-końcowa odpowiada za zależną od związania liganda aktywację transkrypcji [12, 18]. Wiązanie androgenów z receptorem prowadzi do zmian konformacyjnych, powodując oddysocjowanie białek szoku cieplnego, fosforylację receptora, dimeryzację kompleksów hormon-receptor oraz ich translokację do jądra komórkowego, gdzie wiążą się do sekwencji ARE w promotorze genu docelowego. Następnie, po rekrutacji specyficznych koregulatorów i czynników transkrypcyjnych, aktywują transkrypcję genu docelowego [65]. Alternatywnym do „klasycznego” mechanizmu działania androgenów przez receptory jądrowe, prowadzącego do regulacji ekspresji genów androgenozależnych, jest wywoływanie przez te hormony efektów biologicznych na drodze pozagenomowej, „nieklasycznej” [75]. Efekty androgenów wywołane na drodze pozagenomowej związane są ze zwiększeniem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia oraz aktywacją kaskad kinaz białkowych: PKA, PKC, PLC-PIP₂, MAPK, PI₃K [58].

U wszystkich gatunków ssaków, również u świni, różnicowanie jąder pozostaje pod kontrolą androgenów. Jak już wspomniano, w płodowych jądrach świni synteza androgenów rozpoczyna się około 30 dnia po zapłodnieniu, co jest ściśle związane z rozwojem fenotypu męskiego. Badania Haeussler i wsp. [35] wskazują, że po szczycie produkcji androgenów u świni, który ma miejsce między 35 a 38 dniem ciąży, ich synteza spada. Jednak obecność enzymu CYP17 w płodowych komórkach Leydiga w środkowej i późnej ciąży, wskazuje na ich aktywność w produkcji androgenów przez cały okres życia płodowego [46]. Ponadto wydaje się, że jądra świni są wrażliwe na poziom androgenów przez cały okres

płodowy, co jest związane z obecnością AR w komórkach Leydiga, Sertoliego oraz mioidalnych [15]. Produkowane przez komórki Leydiga androgeny regulują rozwój męskiego układu rozrodczego oraz spermatogenezę. Androgeny ogrywają podstawową rolę w kontroli spermatogenezy u dorosłych samców. Jak dotąd nie opisywano wpływu tych hormonów na rozwój płodowych komórek płciowych. Jednak Merlet i wsp. [57] wykazali, że androgeny regulują prawidłową proliferację gonocytów w płodowych jądrach myszy. Ponadto kluczową rolę w kontroli rozwoju komórek płciowych odgrywają komórki Sertoliego. Wykazano, że wpływ androgenów na spermatogenezę odbywa się pośrednio, poprzez komórki Sertoliego. Prawdopodobnie androgeny działając na drodze pozagenomowej regulują adhezję komórek płciowych i komórek Sertoliego [75].

Interesującym zjawiskiem wydaje się ekspresja AR oraz CYP17 również w płodowych jajnikach świni w okresie środkowej i późnej ciąży, co wykazały dotychczas prowadzone przez nasz zespół badania. AR zlokalizowano w komórkach stromy otaczających gniazda komórek płciowych oraz w komórkach ziarnistych, podczas gdy CYP17 obserwowano w gniazdach komórek płciowych oraz w oocytach tworzących się pęcherzyków [15, 46]. Biorąc pod uwagę doniesienia Goxe i wsp. [32], wskazujące na obecność testosteronu w osoczu płodów żeńskich, wydaje się prawdopodobne, że płodowe jajniki mogą być również zaangażowane w syntezę androgenów. Lokalizacja AR w płodowych gonadach świni sugeruje, że androgeny mogą odgrywać rolę podczas rozwoju zarówno gonady męskiej, jak i żeńskiej. Bieżące doniesienia pozwalają zakładać udział androgenów w koordynacji wczesnych etapów folikulogenezy u świni [24, 26]. U myszy z wyłączonym genem receptora androgenowego (ARKO) obserwowano mniejszą ilość pęcherzyków jajnikowych i mniejszą ilość potomstwa [77]. Z kolei nadmiar androgenów w okresie życia płodowego u małąp i owiec prowadził do fenotypu charakterystycznego dla zespołu policystycznych jajników [1]. Dowiedziono, że androgeny działając bezpośrednio na oocyt, aktywują tranzycję pęcherzyków pierwotnych do pierwszorzędowych [80]. Ekspozycja na androgeny w okresie prenatalnym powodowała przyspieszenie wzrostu pęcherzyków jajnikowych u owiec [28]. Wykazano również, że androgeny stymulują tranzycję pęcherzyków, wywierając bezpośredni wpływ przez AR i nie są aromatyzowane do estrogenów, które są raczej postrzegane jako inhibitor rozwoju pęcherzyków pierwotnych [49]. Obecnie androgeny uważane są za nowy czynnik mający znaczenie w kontroli folikulogenezy.

Jak wspomniano wcześniej, działanie androgenów na gonady płodowe świni może odbywać się bezpośrednio, poprzez interakcje z receptorami androgenowymi, jednak należy pamiętać, że androgeny mogą również działać pośrednio, po konwersji do estrogenów, poprzez receptory estrogenowe [76].

ESTROGENY

Estrogeny uważane są za hormony mitogenne, promujące wzrost i różnicowanie komórek [82]. Przez wiele lat klasyfikowane były jako żeńskie hormony płciowe. Dopiero odkrycie w jądrach enzymu CYP19 pozwoliło stwierdzić, że estrogeny, obok androgenów, odgrywają znaczącą rolę w funkcjonowaniu męskiego układu rozrodczego, kontrolując m. in. różnicowanie i funkcjonowanie komórek somatycznych oraz germinalnych jądra [9, 16]. U samic, estrogeny wpływają na wiele procesów związanych z funkcjonowaniem jajnika i rozrodem, a także są niezbędne do utrzymania żeńskiego fenotypu komórek somatycznych jajnika, poprzez represję genów warunkujących męski fenotyp [15, 21]. Zarówno niedobór, jak i nadmiar estrogenów w życiu płodowym może wpływać na ilość i jakość pęcherzyków jajnikowych, ich wrażliwość na FSH, a także na obniżenie płodności [2].

Estrogeny wywołują efekty biologiczne poprzez interakcje z receptorami estrogenowymi. Obecnie znane są dwa typy receptora estrogenowego (ESR) będące produktami dwóch różnych genów. W zależności od kolejności ich odkrycia, receptory te nazwano ESR1 (ER α) i ESR2 (ER β) [39]. Receptory estrogenowe, tak jak AR, należą do nadrodziny receptorów pełniących rolę aktywowanych ligandem czynników transkrypcyjnych i podobnie jak inne receptory tej nadrodziny charakteryzują się budową domenową. Dodatkowo, na C-końcu receptora znajduje się domena F o niesprecyzowanej funkcji biologicznej [27, 39].

Wiązanie estrogenów do ESR prowadzi do oddysocjowania białek szoku cieplnego, fosforylacji receptora i dimeryzacji. Powstałe homodimery lub heterodimery kompleksów hormon-receptor wiążą się do elementu ERE w promotorze genu docelowego. ESR odpowiadają zarówno za aktywację, jak i represję transkrypcji genów, co jest determinowane przez wiązanie odpowiednio koaktywatorów lub korepresorów w obrębie domeny E [30, 71]. Aktywowane receptory oprócz wiązania do elementu ERE w DNA mogą również wiązać się za pośrednictwem białek Fos i Jun do sekwencji AP-1 [11]. Także czynniki wzrostu mogą aktywować ESR pod nieobecność steroidu – droga ta polega na fosforylacji domeny A/B przez kaskadę kinaz uruchamianą na drodze przekazywania sygnału od receptorów czynników wzrostu [36]. Ponadto estrogeny mogą wywoływać efekt biologiczny również na drodze pozagenomowej, co jest związane ze zwiększeniem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia oraz aktywacją kaskad kinaz białkowych tj. MAPK, PI $_3$ K [11]. Alternatywnym szlakiem działania estrogenów jest ich wiązanie do receptora GPER (ang. *G Protein-coupled Estrogen Receptor-1*) zlokalizowanego w błonie komórkowej [70].

Badania na transgenicznym myszku z wyłączonymi genami dla receptorów estrogenowych (α ERKO, β ERKO i $\alpha\beta$ ERKO) oraz aromatazy (ArKO), potwierdziły znaczenie estrogenów w regulacji płodności oraz funkcjonowaniu męskiego i żeńskiego układu reprodukcyjnego [22, 69]. U świni estrogeny są syntezowane

w okresie płodowym zarówno przez osobniki męskie, jak i żeńskie [35]. U większości zwierząt, w okresie prenatalnym i neonatalnym, głównym źródłem estrogenów w gonadzie męskiej są komórki Sertoliego, natomiast po osiągnięciu dojrzałości płciowej, komórki Leydiga [19]. Jednak u świni, głównym źródłem estrogenów w okresie płodowym są komórki Leydiga. Ponadto w jądrach świni wykazano wzrost ekspresji CYP19 w drugiej połowie ciąży. Około 75 dnia ciąży, kiedy komórki Leydiga intensywnie proliferują, to komórki płciowe są głównym źródłem CYP19. Jednak po zakończeniu proliferacji komórki Leydiga ponownie wykazują zwiększoną ekspresję CYP19 [35]. Yashwanth i wsp. [82] obserwowali parakrynowe oddziaływanie estrogenów na dojrzewanie komórek Leydiga. W płodowych jądrach świni, w drugiej połowie ciąży, zlokalizowano jedynie ESR2. Receptory te obserwowano w gonocytach, komórkach Leydiga oraz w komórkach mioidalnych, co wskazuje, że estrogeny odgrywają istotną rolę nie tyle w różnicowaniu, co w regulacji funkcji komórek Leydiga oraz procesów spermatogenezy [43]. Albrecht i wsp. [4] wykazali, że w okresie płodowym estrogeny regulują spermatogenezę poprzez bezpośredni wpływ na spermatogonia. Zarówno niedobór, jak i nadmiar endogennych estrogenów w okresie płodowym u pawiana, powodował spadek liczby komórek płciowych zaburzając w ten sposób potencjał reprodukcyjny samca [4]. Ponadto estrogeny są hormonami o działaniu anabolicznym i mogą mieć znaczenie nie tylko w rozwoju gonady, ale również w rozwoju tkanek niereprodukcyjnych płodu, które wykazują ekspresję ESR [43].

Chociaż badania na myszach nie wykazały zaangażowania estrogenów we wczesnych etapach folikulogenezy, to myszy ArKO charakteryzowały się mniejszą ilością pęcherzyków pierwotnych [13]. Również u pawianów po zastosowaniu inhibitora aromatazy *in utero*, stwierdzono mniejszą liczbę pęcherzyków pierwotnych [83]. Ponadto badania Billiar i wsp. [10] wykazały, że estrogeny kontrolują ekspresję α -inhibiny w komórkach pre-ziarnistych i ziarnistych u pawiana. Prawidłowy stosunek aktywiny do α -inhibiny reguluje proces tworzenia pęcherzyków pierwotnych. Zatem estrogeny biorą udział w regulacji folikulogenezy poprzez regulację ekspresji α -inhibiny [10]. Główną rolę w tworzeniu pęcherzyka jajnikowego odgrywa oocyt, który w okresie wczesnej oogenezy jest wrażliwy na poziom estrogenów. Ekspozycja płodowych oocytów myszy na estrogeny pochodzenia matczynego powoduje utrzymanie oocytów w formie gniazd, a spadek poziomu estrogenów po porodzie inicjuje proces rozpadu gniazd oocytów [17]. W przeciwieństwie do gryzoni, u naczelnych estradiol wywiera pozytywny wpływ na oocyty, a brak estrogenów skutkuje zaburzonym rozpadem gniazd na pojedyncze pęcherzyki [83]. Ponadto, nadmiar estrogenów u myszy w okresie płodowym zaburza proces mejozy w oocytach [72].

Produkcja estrogenów w jajnikach świni rozpoczyna się dopiero pod koniec ciąży [63], ale receptory są już obserwowane od 50 dnia po zapłodnieniu – ESR1 w nabłonku płciowym, a ESR2 w komórkach stromy, komórkach ziarnistych oraz jądrze oocytu pęcherzyka pierwotnego [43]. Możliwe oddziaływania autokrynowe

i parakrynowe estrogenów za pośrednictwem ESR1 i ESR2 mogą mieć znaczenie w proliferacji komórek nabłonka, będących rezerwuarem komórek ziarnistych oraz regulować waskularyzację rozwijającego się jajnika. Z kolei obecność ESR2 w oocytach sugeruje, że są one bezpośrednio wrażliwe na estrogeny, ale również na czynniki, które mogą działać za pośrednictwem tego receptora.

CZYNNIKI ZABURZAJĄCE PROCESY ENDOKRYNNE

Działanie hormonów steroidowych może być zaburzane poprzez czynniki będące ich agonistami lub antagonistami. Ostatnie badania wskazują na obecność w środowisku czynników (herbicydów, pestycydów, ksenoestrogenów), które mogą wiązać się do receptorów hormonów steroidowych, a przez to naśladować lub hamować ich działanie. Związki te określa się jako EDCs (ang. *Endocrine Disrupting Chemicals*). Ekspozycja na te czynniki w okresie rozwoju płodowego może prowadzić do zaburzeń rozwoju układu rozrodczego oraz jego funkcjonowania, obserwowanych tuż po urodzeniu, ale również manifestujących się dopiero po osiągnięciu dojrzałości płciowej [38, 84]. W dostępnej literaturze obecne są dwa nurty badań nad znaczeniem steroidów i mechanizmami działania EDCs w rozwoju i funkcjonowaniu gonad. Pierwszym podejściem jest zastosowanie nadmiaru steroidu lub jego agonisty [20, 29, 61, 79], alternatywnym jest ograniczenie działania steroidów przez zastosowanie ich antagonistów [38, 84]. Takie modele badawcze naśladują warunki fizjologicznego nadmiaru lub niedoboru androgenów/estrogenów w celu określenia ich znaczenia w rozwoju płodowych gonad. Potwierdzeniem znaczącej roli androgenów w rozwoju gonad świni są wyniki badań z zastosowaniem antyandrogenu, flutamidu, wskazujące na zaburzenia w funkcjonowaniu dojrzałych jąder i jajników po ograniczeniu działania androgenów w okresie prenatalnym [22, 25, 33, 37, 47, 48]. Ponadto, niedobór androgenów w drugiej połowie ciąży powoduje opóźnienie folikulogenezy w płodowym jajniku świni oraz zaburzenie ekspresji białek odpowiedzialnych za komunikację międzykomórkową w płodowych gonadach świni [44, 45].

Znaczenie estrogenów w rozwoju płodowych gonad potwierdzają również wyniki badań z zastosowaniem *in utero* czynników środowiskowych, naśladujących warunki nadmiaru lub niedoboru tych hormonów, manifestujące się zaburzeniami związanymi z rozwojem jądra i jajnika oraz płodnością [5, 38]. Pierwsze informacje wskazujące na zaburzenia w rozwoju i funkcjonowaniu żeńskiego układu rozrodczego, związane były z zastosowaniem agonisty ESRs, dietylostilbestrolu u ciężarnych kobiet [62]. U samców myszy narażonych na dietylostilbestrol w okresie ich rozwoju płodowego obserwowano liczne zaburzenia, takie jak: kryptorchizm, spodziectwo i nieprawidłowo rozwinięte najądrza [56]. Ekspozycja płodów na 4-tert-octylfenol, związek o słabej aktywności estrogennej, zaburzała ekspresję czynnika SF1 oraz enzymów szlaku steroidogenezy w jądrach szczura [51].

PODSUMOWANIE

Jak się okazuje, androgeny mają znaczenie nie tylko w różnicowaniu gonady męskiej, ale również regulują funkcje gonady żeńskiej. Ponadto estrogeny, zwane dawniej „hormonami żeńskimi”, mają również znaczenie w regulowaniu procesów w płodowym jądrze. W świetle doniesień o wzrastającej ekspozycji na substancje o działaniu hormonalnym, które mogą naśladować, antagonizować czy maskować działanie hormonów steroidowych, takie zachwianie równowagi hormonalnej w rozwijających się gonadach może skutkować zaburzeniami płodności u dorosłych samców i samic.

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana ze środków budżetowych na naukę w latach 2011-2013 w ramach programu Iuventus Plus II (IP2011 024571)

LITERATURA

- [1] ABBOTT DH, BARNETT DK, LEVINE JE, PADMANABHAN V, DUMESIC DA, JACORIS S, TARANTAL AF. Endocrine antecedens of polycystic ovary syndrome in fetal and infant prenatally androgenized female rhesus monkey. *Biol Reprod* 2008; **79**: 154-163.
- [2] ABBOTT DH, PADMANABHAN V, DUMESIC DA. Contributions of androgen and estrogen to fetal programming of ovarian dysfunction. *Reprod Biol Endocrinol* 2006; **4**: 17.
- [3] ADHIKARI D, LIU K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev* 2009; **30**: 438-464.
- [4] ALBRECHT ED, LANE MV, MARSHALL GR, MERCHENTHALER I, SIMORANGKIR DR, POHL CR, PLANT TM, PEPE GJ. Estrogen promotes germ cell and seminiferous tubule development in the baboon fetal testis. *Biol Reprod* 2009; **81**(2): 406-414.
- [5] ALBRECHT ED, PEPE GJ. Estrogen regulation of placental angiogenesis and fetal ovarian development during primate pregnancy. *Int J Dev Biol* 2010; **54**(2-3): 397-408.
- [6] BARRIONUEVO F, BAGHERI-FAM S, KLATTING J, KIST R, TAKETO MM, ENGLERT C, SCHERER G. Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biol Reprod* 2006; **74**: 195-201.
- [7] BENDIXEN E, DANIELSEN M, LARSEN K, BENDIXEN C. Advances in porcine genomics – a toolbox for developing the pig as a model organism for molecular biomedical research. *Brief Funct Genomics* 2010; **9**(3): 208-219.
- [8] BIEJAŃSKA-OSUCHOWSKA Z. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reprod Biol* 2006; **6**: 161-193.
- [9] BILIŃSKA B. Estrogen source and estrogen receptors in the male reproductive system. *ANIR-ANIIP* 2006; **8**: 21-31.
- [10] BILLIAR RB, ZACHOS NC, BURCH MG, ALBRECHT ED, PEPE GJ. Up-regulation of α -inhibin expression in the fetal ovary of estrogen-suppressed baboon is associated with impaired fetal ovarian folliculogenesis. *Biol Reprod* 2003; **68**: 1989-1996.
- [11] BJÖMSTRÖM L, SJÖBERG M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 2005; **19**: 833-842.

- [12] BRINKMANN AO. Molecular mechanisms of androgen action – a historical perspective. *Methods Mol Biol* 2011; **776**: 3-24.
- [13] BRITT KL, DRUMMOND AE, DYSON M, WREFORD NG, JONES ME, SIMPSON ER, FINLAY JK. The ovarian phenotype of the aromatase knockout (ArKO) mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; **79**: 181-185.
- [14] BRITT KL, FINDLAY JK. Regulation of phenotype of ovarian somatic cells by estrogen. *Mol Cell Endocrinol* 2003; **202**: 11-17.
- [15] BUREK M, DUDA M, KNAPCZYK K, KOZIOROWSKI M, SŁOMCZYŃSKA M. Tissue-specific distribution of the androgen receptor (AR) in the porcine fetus. *Acta Histochem* 2007; **109**: 358-365.
- [16] CARREAU S, DE VIENNE C, GALERAUD-DENIS I. Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advances. *Adv Med Sci* 2008; **53**(2): 139-144.
- [17] CHEN Y, JEFFERSON WN, NEWBOLD RR, PADILLA-BANKS E, PEPLING ME. Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo. *Endocrinology* 2007; **148**(8): 3580-3590.
- [18] CLAESSENS F, DENAYER S, VAN TILBORGH N, KERKHOFS S, HEISEN C, HAELENS A. Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nucl Recept Signal* 2008; **6**: e008.
- [19] DELBÈS G, LEVACHER C, HABERT R. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction* 2006; **132**(4): 527-538.
- [20] DIAMANTI-KANDARAKIS E, BOURGUIGNON JP, GIUDICE LC, HAUSER R, PRINS GS, SOTO AM, ZOELLER RT, GORE AC. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Rev* 2009; **30**(4): 293-342.
- [21] DRUMMOND AE. The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol* 2006; **4**: 16-27.
- [22] DUPONT S, KRUST A, GANSMULLER A, DIETRICH A, CHAMBON P, MARK M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors α (ER α) and β (ER β) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 2000; **127**: 4277-4291.
- [23] DURLEJ M, KNAPCZYK-STWORA K, DUDA M, KOPERA-SOBOTA I, HEJMEJ A, BILIŃSKA B, SŁOMCZYŃSKA M. Prenatal and neonatal exposure to the antiandrogen flutamide alters connexin 43 gene expression in adult porcine ovary. *Domest Anim Endocrinol* 2011; **40**(1): 19-29.
- [24] DURLEJ M, KNAPCZYK-STWORA K, DUDA M, GALAS J, SŁOMCZYŃSKA M. The expression of FSH receptor (FSHR) in the neonatal porcine ovary and its regulation by flutamide. *Reprod Domest Anim* 2011; **46**: 377-384.
- [25] DURLEJ M, KNAPCZYK-STWORA K, SŁOMCZYŃSKA M. Prenatal and neonatal flutamide administration increases proliferation and reduces apoptosis in large antral follicles of adult pigs. *Anim Reprod Sci* 2012; **132**(1-2): 58-65.
- [26] DURLEJ M, KOPERA I, KNAPCZYK-STWORA K, HEJMEJ A, DUDA M, KOZIOROWSKI M, SŁOMCZYŃSKA M, BILIŃSKA B. Connexin43 gene expression in male and female gonads of porcine offspring following in utero exposure to an anti-androgen, flutamide. *Acta Histochem* 2011; **113**: 6-12.
- [27] ELLMANN S, STICHT H, THIEL F, BECKMANN MW, STRICK R, STRISSEL PL. Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci* 2009; **66**: 2405-2426.
- [28] FORSDIKE RA, HARDY K, BULL L, STARK J, WEBBER LJ, STUBBS S, ROBINSON JE, FRANKS S. Disordered follicle development in ovaries of prenatally androgenized ewes. *J Endocrinol* 2007; **192**: 421-428.
- [29] FOWLER PA, BELLINGHAM M, SINCLAIR KD, EVANS NP, POCAR P, FISCHER B, SCHAEDELICH K, SCHMIDT J-S, AMEZAGA MR, BHATTACHARYA S, RHIND SM, O'SHAUGHNESSY PJ. Impact of endocrine-disrupting compounds (EDCs) on female reproductive health. *Mol Cell Endocrinol* 2012; **355**: 231-239.
- [30] GAO H, DAHLMAN-WRIGHT K. The gene regulatory networks controlled by estrogens. *Mol Cell Endocrinol* 2011; **334**(1-2): 83-90.
- [31] GARRETT WM, GUTHRIE HD. Expression of Bcl-2 and 3- β hydroxysteroid dehydrogenase protein during oocyte and follicle development in fetal and post-natal pig ovaries. *Reprod Fertil Dev* 1999; **11**: 463-470.

- [32] GOXE B, PRUNIER A, REMY J-J, SALESSE R. Ontogeny of gonadal luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in the fetal pig and related changes in gonadotropin and testosterone secretion. *Biol Reprod* 1993; **49**: 609-616.
- [33] GRZESIAK M, KNAPCZYK-STWORA K, DUDA M, SŁOMCZYŃSKA M. Elevated level of 17 β -estradiol is associated with overexpression of FSHR, CYP19A1, and CTNNB1 genes in porcine ovarian follicles after prenatal and neonatal flutamide exposure. *Theriogenology* 2012; **78**(9): 2050-2060.
- [34] HAEUSSLER SA, CLAUS R. Expression of the glucocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 in pig testes cells along fetal development. *Reprod Fertil Dev* 2007; **19**: 664-669.
- [35] HAEUSSLER S, WAGNER A, WELTER H, CLAUS R. Changes of testicular aromatase expression during fetal development in male pigs (sus scrofa). *Reproduction* 2007; **133**: 323-330.
- [36] HALL JM, COUSE JF, KORACH KS. The multifaceted mechanism of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 2001; **276**: 36869-36872.
- [37] HEJMEJ A, KOPERA I, KOTULA-BALAK M, LYDKA M, LENARTOWICZ M, BILINSKA B. Are expression and localization of tight and adherens junction proteins in testes of adult boar affected by foetal and neonatal exposure to flutamide? *Int J Androl* 2012; **35**(3): 340-352.
- [38] HEJMEJ A, KOTULA-BALAK M, BILINSKA B. Antiandrogenic and estrogenic compounds: effect on development and function of male reproductive system. W: Abduljabbar H [red.] *Steroids – Clinical Aspect*, InTech, 2011; 51-82.
- [39] HELDRING N, PIKE A, ANDERSSON S, MATTHEWS J, CHENG G, HARTMAN J, TUJAGUE M, STROM A, TREUTER E, WARNER M, GUSTAFSSON JA. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 2007; **87**: 905-931.
- [40] HIRAWAT S, BUDMAN DR, KRES W. The androgen receptor: structure, mutations, and antiandrogens. *Cancer Invest* **21**: 400-417.
- [41] HUGHES IA. Minireview: sex differentiation. *Endocrinology* 2001; **142**: 3281-3287.
- [42] JOST A. Recherches sur la differentiation sexuelle de l'embryon de lapin. *Archs Anat Microsc Morph Exp* 1947; **36**: 271-315.
- [43] KNAPCZYK K, DUDA M, SZAFRAŃSKA B, WOLSZA K, PANASIEWICZ G, KOZIOROWSKI M, SŁOMCZYŃSKA M. Immunolocalisation of oestrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) in porcine embryos and fetuses at different stages of gestation. *Acta Vet Hung* 2008; **56**(2): 221-233.
- [44] KNAPCZYK-STWORA K, DURLEJ-GRZESIAK M, CIERESZKO RE, KOZIOROWSKI M, SŁOMCZYŃSKA M. Antian-drogen flutamide affects folliculogenesis during fetal development in pigs. *Reproduction* 2013; **145**: 265-276.
- [45] KNAPCZYK-STWORA K, GRZESIAK M, SŁOMCZYŃSKA M. *In utero* exposure to anti-androgen flutamide influences connexin 43 and β -catenin expression in the porcine fetal gonads. *Domest Anim Endocrinol* 2013; **44**: 185-194.
- [46] KNAPCZYK-STWORA K, STERNAK M, DURLEJ M, SŁOMCZYŃSKA M. Immunolocalization of cytochrome P450 17alpha-hydroxylase/c17-20 lyase in the ovary of pregnant pigs and fetal gonads. *Reprod Biol* 2011; **11**(2): 71-82.
- [47] KOPERA I, DURLEJ M, HEJMEJ A, KNAPCZYK-STWORA K, DUDA M, SŁOMCZYŃSKA M, BILINSKA B. Differential expression of connexin 43 in adult pig testes during normal spermatogenic cycle and after flutamide treatment. *Reprod Domest Anim* 2011; **46**(6): 1050-1060.
- [48] KOTULA-BALAK M, HEJMEJ A, KOPERA I, LYDKA M, BILINSKA B. Prenatal and neonatal exposure to flutamide affects function of Leydig cells in adult boar. *Domest Anim Endocrinol* 2012; **42**(3): 142-154.
- [49] LIU L, RAJAREDDY S, REDDY P, DU C, JAGARLAMUDI K, SHEN Y, GUNNARSSON D, SELSTAM G, BOMAN K, LIU K. Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. *Development* 2007; **134**: 199-209.
- [50] LOFFLER KA, KOOPMAN P. Charting the course of ovarian development in vertebrates. *Int J Dev Biol* 2002; **46**: 503-510.

- [51] MAJDIC G, SHARPE RM, SAUNDERS PT. Maternal oestrogen/xenoestrogen exposure alters expression of steroidogenic factor-1 (SF-1/Ad4BP) in the fetal rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 1997; **127**(1): 91-98.
- [52] MARTINEZ-ARGUELLES, PAPADOPOULOS V. Epigenetic regulation of the expression of genes involved in steroid hormone biosynthesis and action. *Steroids* 2010; **75**: 467-476.
- [53] MCCOARD SA, LUNSTRA DD, WISE TH, FORD JJ. Specific staining of Sertoli cell nuclei and evaluation of Sertoli cell number and proliferative activity in Meishan and White Composite boars during the neonatal period. *Biol Reprod* 2001; **64**(2): 689-695.
- [54] MCCOARD SA, WISE TH, FORD JJ. Expression levels of Mullerian-inhibiting substance, GATA4 and 17alpha-hydroxylase/17,20-lyase cytochrome P450 during embryonic gonadal development in two diverse breeds of swine. *J Endocrinol* 2002; **175**(2): 365-374.
- [55] MCCOARD SA, WISE TH, LUNSTRA DD, FORD JJ. Stereological evaluation of Sertoli cell ontogeny during fetal and neonatal life in two diverse breeds of swine. *J Endocrinol* 2003; **178**: 395-403.
- [56] McLACHLAN JA, NEWBOLD RR, BUROW ME, LI SF. From malformations to molecular mechanisms in the male: three decades of research on endocrine disrupters. *APMIS* 2001; **109**(4): 263-272.
- [57] MERLET J, RACINE C, MOREAU SG, MORENO SG, HABERT R. Male fetal germ cells are targets for androgens that physiologically inhibit their proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**(9): 3615-3620.
- [58] MICHELS G, HOPPE UC. Rapid actions of androgens. *Front Neuroendocrinol* 2008; **29**: 182-198.
- [59] MILLER WL, AUCHUS RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* 2011; **32**: 81-151.
- [60] NILSSON EE, SKINNER MK. Progesterone regulation of primordial follicle assembly in bovine fetal ovaries. *Mol Cell Endocrinol* 2009; **313**: 9-16.
- [61] ORTEGA HH, SALVETTI NR, PADMANABHAN V. Developmental programming: prenatal androgen excess disrupts ovarian steroid receptor balance. *Reproduction* 2009; **137**: 865-877.
- [62] PADMANABHAN V, VEIGA-LOPEZ A, ABBOTT DH, DUMESIC DA. Developmental programming of ovarian dysfunction. W: González-Bulnes A [red.] Novel concepts of ovarian endocrinology. Transworld Research Network, Kerala, India; 2007: 329-352.
- [63] PAILHOX E, MANDON-PEPIN B, COTINOT C. Mammalian gonadal differentiation: the pig model. *Reprod Suppl* 2001; **58**: 65-80.
- [64] PAYNE AH, HALES DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* 2004; **25**: 947-970.
- [65] PATRÃO MT, SILVA EJ, AVELLAR MC. Androgens and the male reproductive tract: an overview of classical roles and current perspectives. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009; **53**(8): 934-945.
- [66] PIPEK RP. Molecular and cellular machinery of gonadal differentiation in mammals. *Int J Dev Biol* 2010; **54**: 779-786.
- [67] REDDY P, ZHENG W, LIU K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends Endocrinol Metab* 2009; **21**: 96-103.
- [68] RODRIGUES P, LIMBACK D, MCGINNIS L, PLANCHA CE, ALBERTINI DF. Oogenesis: prospects and challenges for the future. *J Cell Physiol* 2008; **216**(2): 355-365.
- [69] SAUNDERS PT. Does estrogen receptor β play a significant role in human reproduction? *Trends Endocrinol Metab* 2005; **16**: 222-227.
- [70] SIRIANNI R, CHIMENTO A, RUGGIERO C, DE LUCA A, LAPPANO R, ANDO S, MAGGIOLINI M, PEZZI V. The novel estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30, mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol on mouse spermatogonial GC-1 cell line. *Endocrinology* 2008; **149**: 5043-5051.
- [71] STANISIC V, LONARD DM, O'MALLEY BW. Modulation of steroid hormone receptor activity. *Prog Brain Res* 2010; **181**: 153-176.
- [72] SUSIARJO M, HASSOLD TJ, FREEMAN E, HUNT PA. Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse. *PLoS Genet* 2007; **3**(1): e5.
- [73] SZOŁTYŚ M. Struktura i funkcja pęcherzyków jajnikowych ssaków. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 221-238.
- [74] SZOŁTYŚ M. Hormonalna regulacja procesu rekrutacji, selekcji i dominacji w rozwoju pęcherzyków jajnikowych ssaków. *Wyd. UJ, Kraków*, 2000; 1-23.

- [75] WALKER WH. Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; **365**(1546): 1557-1569.
- [76] WALTERS KA, ALLAN CM, HANDELSMAN DJ. Androgen actions and the ovary. *Biol Reprod* 2008; **78**: 380-389.
- [77] WALTERS KA, ALLAN CM, JIMENEZ M, LIM PR, DAVEY RA, ZAJAC JD, ILLINGWORTH P, HANDELSMAN DJ. Female mice haploinsufficient for an inactivated androgen receptor (AR) exhibit age-dependent defects that resemble the AR null phenotype of dysfunctional late follicle development, ovulation, and fertility. *Endocrinology* 2007; **148**: 3674-3684.
- [78] WILHELM D, PALMER S, KOOPMAN P. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev* 2007; **87**: 1-28.
- [79] XITA N, TSATSOULIS A. Fetal programming of polycystic ovary syndrome by androgen excess: evidence from experimental, clinical, and genetic association studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**(5): 1660-1666.
- [80] YANG J-L, ZHANG C-P, LI L, HUANG L, JI S-Y, LU C-L, FAN C-H, CAI H, REN Y, HU Z-Y, GAO F, LIU Y-X. Testosterone induces redistribution of Forkhead Box-3a and down-regulation of Growth and Differentiation Factor 9 messenger ribonucleic acid expression in early stage of mouse folliculogenesis. *Endocrinology* 2010; **151**: 774-782.
- [81] YAO HHC. The pathway to femaleness: current knowledge on embryonic development of the ovary. *Mol Cell Endocrinol* 2005; **230**: 87-93.
- [82] YASHWANTH R, RAMA S, ANBALAGAN M, JAGANNADHA RAO A. Role of estrogen in regulation of cellular differentiation: A study using human placental and rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 2006; **246**: 114-120.
- [83] ZACHOS NC, BILLIAR RB, ALBRECHT ED, PEPE GJ. Developmental regulation of baboon fetal ovarian maturation by estrogen. *Biol Reprod* 2002; **67**: 1148-1156.
- [84] ZAMA AM, UZUMCU M. Epigenetic effects of endocrine-disrupting chemicals on female reproduction: an ovarian perspective. *Front Neuroendocrinol* 2010; **31**: 420-439.
- [85] ZIĘCIK A, KACZMAREK M, BOGACKI M. Oogeneza, zapłodnienie, implantacja zarodka i okres wczesnej ciąży. W: T. Krzymowski [red.] *Fizjologiczna regulacja procesów rozrodczych samicy*. Wyd. UWM, Olsztyn, 2007; 331-364.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 15.04.2013

Przyjęto: 02.06.2013

Katarzyna Knapczyk-Stwora

Zakład Endokrynologii, Instytutu Zoologii

Uniwersytet Jagielloński

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: (12) 664 50 32

e-mail: katarzyna.knapczyk@uj.edu.pl

